



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

LUIS CARLOS PIRES RAYOL FILHO

**ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
MÉDICA VETERINÁRIO DA FAV - UnB**

**Relatório de estágio para conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília - UnB**

Brasília DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

LUIS CARLOS PIRES RAYOL FILHO

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
MÉDICA VETERINÁRIO DA FAV - UnB

Relatório de estágio para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Orientadora:
Profa. Dra. Simone Perecmanis

Brasília DF

2013

Pires Rayol Filho, Luis Carlos

Atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV - UnB/ Luis Carlos Pires Rayol Filho, orientação de Simone Perecmanis – Brasília 2013.

Relatório de Estágio – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Luis Carlos Pires Rayol Filho

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV - UnB.

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

(Assinatura)

Luis Carlos Pires Rayol Filho

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: PIRES RAYOL FILHO, LUIS CARLOS

Título: Atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Médica do Hospital Veterinário de Animais de Companhia da UnB.

Relatório de estágio para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Orientadora:

Profa. Dra. Simone Perecmanis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Simone Perecmanis

Instituição: UnB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

MSc. Hudson H. de Andrade

Instituição: UnB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Mv. Luciana F. L. Souza

Instituição: UnB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*À minha família, que sempre
me apoiou durante o curso e
em todas as minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Sandra Maria de Moura Barbosa, ao meu pai, Luis Carlos Pires Rayol, e à Maria da Graça Dias, minha segunda mãe, pelo suporte e sábios conselhos.

Às minhas irmãs e avós, pelo carinho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Simone Perecmanis, pela confiança em mim depositada e contribuições ao meu trabalho.

Aos residentes Marcus Portugal, Diego Ribeiro, Luciana Lobo e Marcela Lobo e aos técnicos Hudson Holanda e Cleia Nunes, pela paciência e prontidão durante o meu estágio.

Aos professores da FAV Eduardo Maurício Mendes de Lima, Ivo Pivatto, Rodrigo Arruda de Oliveira e Marcelo Ismar Silva Santana, pelos ensinamentos.

Aos meus amigos da veterinária, em especial, Camilla Vasconcelos (Bolí), Diego Barnabé, João Paulo Barbosa, Caio Luongo, Gabriel Borges, Thiago Capozzi (Tetão), Arthur Victor (Vinteum), Marcus Damasceno (Marcola), Ramon Espindola, Rafael Marques, Thais Chiozzini e Camilla Becon, pelas boas memórias e experiências vividas no decorrer do curso.

Aos meus amigos Arthur Banício, Felipe Bortoli, Sara Soyaux e Stephanie Corsi.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Estrutura do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV – UnB.....	2
2.1. Setor de preparo de meios e soluções:	2
2.2. Setor de lavagem e esterilização:	3
2.3. Setor de bacteriologia e micologia:.....	3
3. Atividades realizadas	5
3.1. Preparo dos meios de cultura mais utilizados na rotina do laboratório e seus usos	5
3.1.1. Ágar Sangue®	7
3.1.2. Ágar MacConkey®	7
3.1.3. Ágar EMB®	7
3.1.4. Ágar CLED®	7
3.1.5. Ágar Cetrimidas®	8
3.1.6. Ágar Müller Hinton® e Müller Hinton® Sangue	8
3.1.7. Ágar Mycosel®	8
3.1.8. Ágar Sabouraud®	8
3.1.9. Caldo Tioglicolato®	9
3.1.10. Caldo BHI®	9
3.2. Testes de identificação mais utilizados na rotina do laboratório	9
3.2.1. Coloração de Gram.....	9
3.2.2. Teste do hidróxido de potássio (KOH).....	10
3.2.3. Teste de catalase.....	11
3.2.4. Teste de oxidase.....	12
3.2.5. Teste de Hugh e Leifson (oxidação/fermentação da glicose)	12
3.2.6. Teste de indol.....	13
3.2.7. Teste de vermelho de metila (VM)	14
3.2.8. Teste de Vogues Prokauer (VP)	15
3.2.9. Teste de citrato.....	16
3.2.10. Teste de ágar TSI.....	17
3.2.11. Testes de fermentação de açúcares	18
3.2.12. Testes de descarboxilação de aminoácidos.....	19
3.2.13. Método de fita adesiva para identificação de fungos dermatófitos	20
3.3. Antibiógramas (método de difusão por disco ou Kirby Bauer)	21
3.4. Bactérias mais frequentemente identificadas na rotina do laboratório	22
3.4.1. <i>Staphylococcus</i> spp.	23
3.4.2. <i>Streptococcus</i> spp.	23
3.4.3. <i>Escherichia coli</i>	24
3.4.4. <i>Corynebacterium</i> spp.	24
3.5. Fungos mais frequentemente identificados na rotina do laboratório.....	25
3.5.1 Fungos dermatófitos	25
3.5.2. <i>Malassezia pachydermatis</i>	26
4. Rotina do laboratório	28
4.1. Inoculação e incubação de amostras.....	29
4.2. Urina para pesquisa de <i>Leptospira</i> spp.	31
4.3. Isolamento e repique de amostras bacterianas	31
4.4. Identificação de bactérias	32
4.5. Antibiógrama.....	35
4.6. Inoculação e incubação de amostras fúngicas e identificação de fungos.....	35
4.7. Emissão de laudos.....	35

5. Considerações finais.....	38
6. Referências bibliográficas	39

1. Introdução

A microbiologia veterinária é responsável pelo isolamento e identificação de um grande número de microrganismos causadores ou, frequentemente, associados a doenças infecciosas dos animais. A contribuição do laboratório de diagnóstico microbiológico na confirmação de doenças infecciosas em animais e na seleção de drogas quimioterapêuticas apropriadas é influenciada por fatores relacionados à espécie do microrganismo (tipo e qualidade da espécie, precisão no acompanhamento do histórico do paciente, estágio da doença no qual a amostra foi coletada e cuidados durante a coleta) e pelo laboratório (instalações do laboratório, experiência da equipe do laboratório e do conteúdo do laudo) (QUINN et al., 1994).

As amostras enviadas ao laboratório de microbiologia devem ser obtidas preferencialmente de animais vivos e antes da antibioticoterapia. Amostras obtidas de animais mortos devem ser colhidas o mais rápido e, se possível, antes das alterações autolíticas (QUINN et al., 2005).

Este relatório teve como objetivo descrever os procedimentos e atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia Médica Médica FAV - UnB no período de 19 de agosto de 2013 a 15 de novembro de 2013.

2. Estrutura do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV – UnB

O laboratório fica localizado próximo ao Hospital Veterinário de Animais de Companhia da UnB. É dividido em três setores: setor de preparo de meios e soluções, setor de lavagem e esterilização e setor de bacteriologia e micologia.

2.1. Setor de preparo de meios e soluções:

É o setor onde são preparados os meios de cultura e soluções. Também é o local onde são estocados os substratos e materiais usados em seu preparo.

Os seguintes equipamentos estão presentes nesse setor: materiais para o preparo de meios e soluções (béqueres, erlenmeyers, pipetas, provetas, bastões de vidros, entre outros), balança de precisão, pHmetro, forno de micro-ondas, estufa para secagem de materiais plásticos, estufa para secagem de vidraria, banho-maria, pia e reservatório para água destilada. A figura 22 mostra a Sala de Preparo de Meios e Soluções, evidenciando, da esquerda para a direita, o armário onde são guardados os meios desidratados, balança de precisão, banho-maria e pia.



Figura 1 - Setor de Preparo de Meios e Soluções. Armário para armazenamento de meios desidratados (1), balança de precisão (2), banho-maria (3) e pia (4).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

2.2. Setor de lavagem e esterilização:

Nesse setor as vidrarias e outros materiais usados no laboratório são lavados e esterilizados por autoclave e é, também, a área onde se realiza a esterilização de materiais a serem descartados.

A Sala de Lavagem e Esterilização conta com os seguintes equipamentos: autoclave para descarte de materiais de risco biológico, autoclave para esterilização de meios de cultura e vidraria, estufa para secagem de materiais plásticos, estufa para secagem de vidraria, pia, destilador e reservatórios de água destilada. A figura 23 mostra a Sala de Lavagem e Esterilização, evidenciando, da esquerda para a direita, a autoclave para esterilização de material de risco biológico, autoclave para esterilização de meios de cultura e vidraria, estufa para vidraria e estufa para materiais plásticos.



Figura 2 - Setor de Lavagem e Esterilização. Autoclave para esterilização de material de risco biológico (1), autoclave para esterilização de meios de cultura e vidraria (2) estufa para vidraria (3) e estufa para materiais plásticos (4).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

2.3. Setor de bacteriologia e micologia:

É o setor de recebimento de amostras, cultura e isolamento fúngico e bacteriano, realização de antibiogramas e distribuição de meios de cultura.

Os principais equipamentos e materiais contidos nesse setor são: duas estufas para cultivo microbiológico, duas geladeiras para armazenamento de meios de cultura e testes bioquímicos, uma geladeira para armazenamento de material contaminado, duas pias, dois

bicos de Bunsen, dois microscópios ópticos, um microscópio de campo escuro, capela de fluxo laminar e insumos utilizados na rotina (álcool 70%, reagentes para coloração de gram, reagentes para os testes bioquímicos, lâminas para microscopia, placas de Petri, entre outros). A figura 24 mostra a Sala de Bacteriologia e Micologia, evidenciando, da esquerda para a direita, a estufa para cultivo microbiológico, capela de fluxo laminar e as bancadas com bicos de Bunsen.



Figura 3 - Setor de Bacteriologia e Micologia. Estufa para cultivo microbiológico (1), capela de fluxo laminar (2) e bancadas com bicos de Bunsen (3).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3. Atividades realizadas

3.1. Preparo dos meios de cultura mais utilizados na rotina do laboratório e seus usos

Os meios de cultura são preparados em recipientes próprios à partir dos meios desidratados dissolvidos em água destilada, aquecidos e, em seguida, resfriados à 25°C, para que seja feita a medida do seu pH. Se necessário, a correção do pH do meio é feita através da adição de hidróxido de sódio (NaOH), para alcalinizá-lo, ou de ácido clorídrico (HCl), para acidificá-lo. Após a correção do pH, os meios são esterilizados na autoclave por 15 minutos a 121°C (POP 17_00).

Os meios de cultura sólidos são distribuídos dentro da capela de fluxo laminar, previamente esterilizada com luz ultravioleta por 15 minutos, em placas de Petri, de modo a preenche-las até a metade de sua altura total, ou pipetados em tubos de ensaio para serem solidificados em formato de bizel. Preconiza-se que os meios sólidos estejam solidificados antes que as placas sejam tampadas e retiradas da capela. Após retirados da capela, os meios são guardados na geladeira com temperatura entre 2°C e 8°C, em posição invertida (POP 17_00). Uma amostragem de 5% do número de placas de cada meio preparado é mantida na estufa de cultivo microbiológico por vinte e quatro horas como controle de contaminação.

Os meios de cultura líquidos são distribuídos em tubos de acordo com quantidades determinadas e esterilizados em autoclave. As figuras 1 e 2 mostram os principais meios de cultura usados no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília.

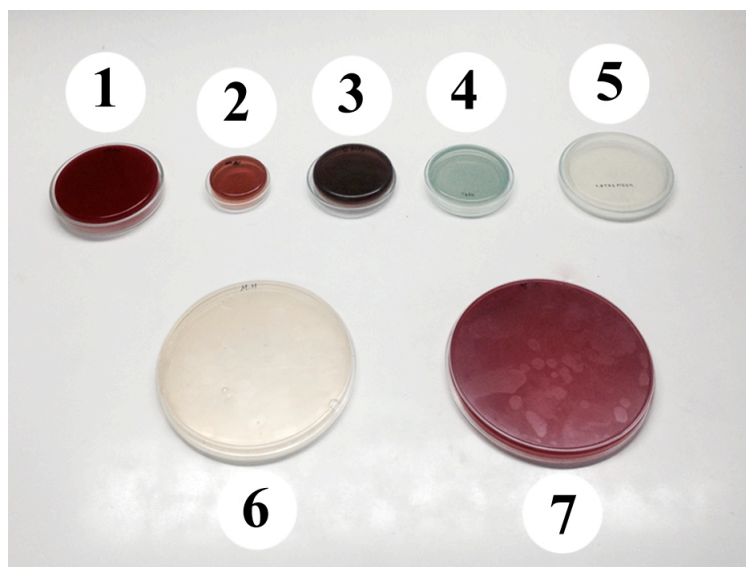


Figura 4 - Principais meios de cultura usados no laboratório: ágar sangue[®] (1), ágar MacConkey[®] (2), ágar EMB[®] (3), ágar CLED[®] (4), ágar cetrimidas[®] (5), ágar Müller Hinton[®] (6) e ágar Müller Hinton[®] sangue (7).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

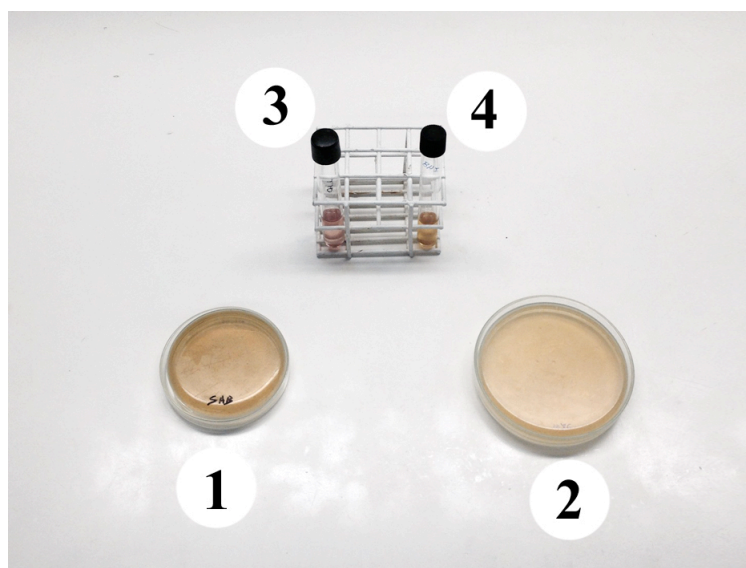


Figura 5 - Principais meios de cultura usados no laboratório: ágar Sabouraud[®] (1), ágar Mycosel[®] (2), caldo tioglicolato[®] (3) e caldo BHI[®] (4).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.1.1. Ágar Sangue®

O ágar sangue® é o meio de eleição para o isolamento primário na rotina, pois favorece o crescimento da maioria das bactérias patogênicas, além de permitir o reconhecimento da produção de hemolisinas (QUINN et al., 2005).

Após autoclavado, o ágar sangue base® é resfriado até a temperatura de 45°C a 50°C e levado à capela de fluxo laminar onde é adicionado 5% do seu volume de sangue de carneiro desfibrinado estéril (BIOBRÁS).

3.1.2. Ágar MacConkey®

O ágar MacConkey® contém sais biliares e cristal violeta, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas (ANVISA, 2004). Esse meio de cultura contém também lactose e o indicador de pH vermelho neutro, que cora em rosa os microrganismos que fermentam a lactose, produzindo metabólitos ácidos (QUINN et al., 2005).

3.1.3. Ágar EMB®

O ágar EMB® (Eosina Azul de Metileno) é usado para o isolamento e diferenciação de enterobactérias (BIOBRÁS). Esse meio é usado na diferenciação entre *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, sendo que as colônias de *Escherichia coli* tem centros de coloração púrpura escuro à luz transmitida e brilho verde metálico à luz refletida e as colônias de *Enterobacter aerogenes* tem centros marrom-acinzentados em luz transmitida e, normalmente, não apresentam brilho metálico à luz refletida (OXOID, 2000).

3.1.4. Ágar CLED®

O ágar CLED® (Cistina-Lactose-Deficiente em Eletrólitos) é recomendado para exames bacteriológicos de urina, pois permite o crescimento dos microrganismos potencialmente patogênicos presentes na urina (OXOID, 2000). Esse meio de cultura inibe o crescimento em véu de colônias de *Proteus* spp (BIOBRÁS). Colônias fermentadoras de lactose adquirem coloração amarelada e colônias não fermentadoras de lactose adquirem coloração azulada.

3.1.5. Ágar Cetrimidas®

O ágar Cetrimidas® favorece o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e a produção de piocianina. As colônias de *P. aeruginosa* tem coloração verde azulada e ficam fluorescentes na luz negra, devido à produção de fluoresceína (BIOBRÁS). A piocianina é um pigmento verde produzido por cerca de 98% das cepas de *P. aeruginosa*, constituindo um fator importante para sua identificação, visto que nenhuma outra bactéria não fermentadora produz esse pigmento (KONEMAN et al., 2001).

3.1.6. Ágar Müller Hinton® e Müller Hinton® Sangue

O ágar Müller Hinton® é usado na avaliação da sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma) pelo método de difusão de discos. Para microrganismos de crescimento fastidioso, é necessária a adição de 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril (BIOBRÁS).

3.1.7. Ágar Mycosel®

O ágar Mycosel® (Micobiótico®) é usado no isolamento de fungos patogênicos, em especial, dermatófitos. Contém cloranfenicol, que inibe o crescimento de bactérias e de alguns fungos filamentosos, e cicloheximida, cuja função é selecionar fungos dermatófitos (ANVISA, 2004).

3.1.8. Ágar Sabouraud®

O ágar Sabouraud® favorece o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos (ANVISA, 2004). Esse meio é usado para trabalhos gerais em micologia, ou seja, isolamento, identificação e conservação de fungos saprófitas e patogênicos. Sendo assim, caso os materiais de estudo estejam excessivamente contaminados, pode-se adicionar substâncias antimicrobianas seletivas, como o cloranfenicol, cicloheximida, penicilina e estreptomicina (BIOBRÁS).

3.1.9. Caldo Tioglicolato[®]

O caldo Tioglicolato[®] pode ser usado no cultivo de microrganismos aeróbios e anaeróbios. É tamponado, portanto, inóculos ácidos ou básicos não alteram o pH do meio de maneira significativa. O tioglicolato presente nesse meio é responsável por neutralizar a ação bacteriostática de compostos mercuriais, evitando resultados falso-negativos, caso a solução testada contenha algum conservante dessa natureza (OXOID, 2000).

Outra função do tioglicolato é a de estabelecer um nível baixo de tensão de oxigênio, já que é um agente redutor, o que favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios e microaerófilos (BIOBRÁS).

3.1.10. Caldo BHI[®]

O caldo BHI[®] (*Brain Heart Infusion*) é um meio derivado de nutrientes do cérebro, coração, peptona e dextrose (ANVISA, 2004). É usado na recuperação de microrganismos fastidiosos ou não, incluindo bactérias aeróbicas, anaeróbicas e fungos (MBIOLOG, 2010).

3.2. Testes de identificação mais utilizados na rotina do laboratório

Após a obtenção da colônia isolada é necessário realizar testes bioquímicas para a identificação do microrganismo presente em cada cultura.

3.2.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a mais usada na bacteriologia e permite dividir as bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, que adquirem, respectivamente, coloração azul e rosa (SILVA; OLIVEIRA, 2007).

A coloração de Gram é feita da seguinte maneira: deposita-se uma gota de solução salina 0,85% em uma lâmina de vidro e, sobre ela, espalha-se uma pequena alçada da colônia, fixando-as na lâmina, em seguida, passando rapidamente sobre a chama do bico de Bunsen (POP 53_00). A coloração é feita com a aplicação de cristal de violeta, por um minuto, e lugol (solução de iodo e iodeto de potássio), também por um minuto. Depois, a preparação é tratada com álcool ou acetona, que remove o cristal violeta das bactérias Gram-negativas. Aplica-se, então, safranina ou fucsina, respectivamente, por quinze ou quarenta e cinco segundos. Estes

são chamados corantes de contraste, para corar as bactérias Gram-negativas em rosa. Por último, a lâmina é lavada com água e posta para secar naturalmente (SILVA; OLIVEIRA, 2007; POP 53_00). As bactérias coradas são visualizadas no microscópio óptico, no aumento de 1000x. A figura 14 evidencia os reagentes da coloração de Gram: cristal violeta, lugol, fucsina e álcool absoluto, da esquerda para a direita.



Figura 6 - Reagentes para a coloração de Gram: cristal violeta (1), lugol (2), fucsina (3) e álcool absoluto (4).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.2. Teste do hidróxido de potássio (KOH)

O teste do hidróxido de potássio indica se a bactéria é Gram-negativa ou Gram-positiva. Para realizar esse teste, deposita-se uma gota da solução de KOH 3% em uma lâmina de vidro e espalha-se uma alçada da colônia sobre ela por até sessenta segundos. O resultado positivo do teste é indicado pela formação de um gel viscoso, indicando que a colônia bacteriana é Gram-negativa (QUINN, 1994). A figura 3 mostra o resultado positivo para o teste de KOH.

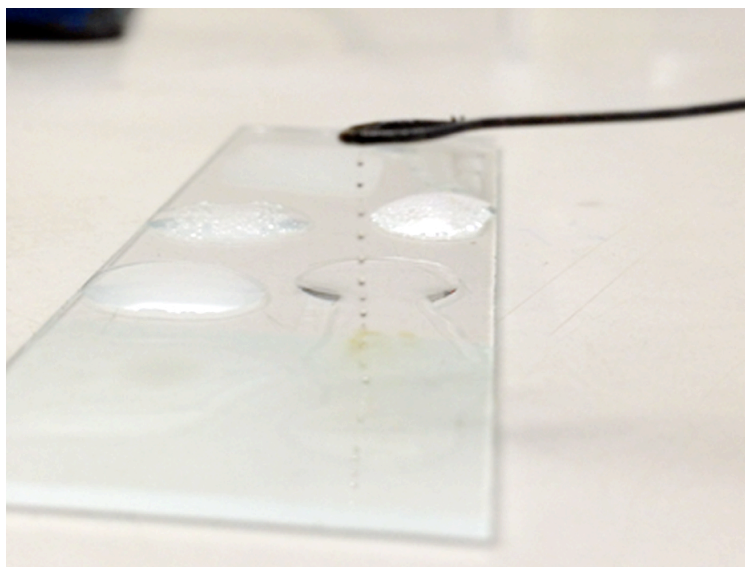


Figura 7 - Formação do fio viscoso no resultado positivo para o teste de KOH

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.3. Teste de catalase

O teste da catalase indica a presença ou não de catalase nas células bacterianas (OLIVEIRA, 2000). A catalase é produzida por diversas bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas e faz a quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água (QUINN et al., 2005). O resultado positivo do teste traduz-se pela formação de borbulhas quando se coloca uma alçada de colônias em contato com o peróxido de hidrogênio (OLIVEIRA, 2000). A figura 4 mostra um resultado positivo para o teste da catalase.



Figura 8 - Formação de bolhas no teste de catalase positivo.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.4. Teste de oxidase

O teste da oxidase indica a presença ou não de citocromo oxidase C nas células do cultivo bacteriano (QUINN et al., 2005). Deve-se utilizar nesse teste a alça de platina, pois as alças tradicionais contêm ferro, podendo levar a um resultado falso-positivo (QUINN et al., 1994). O sistema de citocromo oxidase está presente somente em microrganismo aeróbios e a maioria das bactérias Gram-positivas são oxidase negativas. O teste é considerado positivo quando a alçada bacteriana, após entrar em contato com a fita, adquire coloração roxa-azulada. Pode-se usar como controle positivo colônias de *Pseudomonas aeruginosa* e como controle negativo, *Escherichia coli* (OLIVEIRA, 2000). A figura 5 demonstra os resultados negativo (à esquerda) e positivo (à direita) para o teste da oxidase.

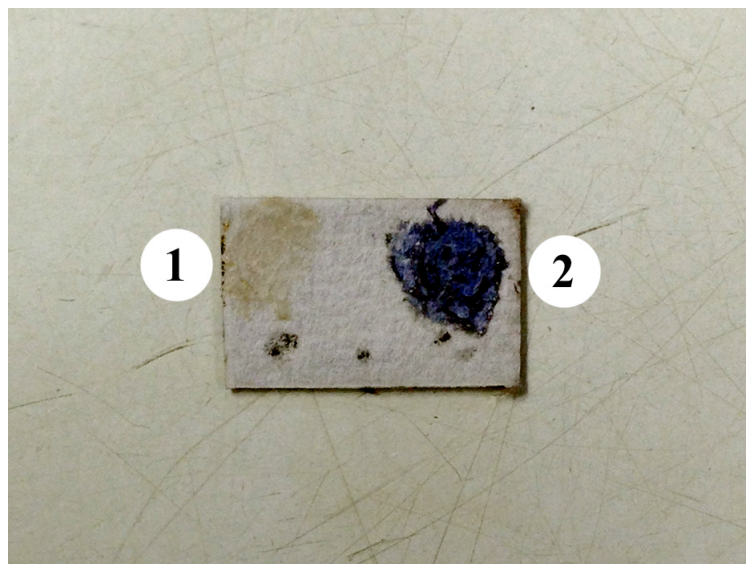


Figura 9 - Resultados negativo (1) e positivo (2) no teste da oxidase.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.5. Teste de Hugh e Leifson (oxidação/fermentação da glicose)

O teste de oxidação/fermentação da glicose demonstra se a bactéria utiliza a glicose por oxidação ou fermentação. O procedimento para esse teste consiste em inocular dois tubos contendo o meio de Hugh e Leifson e glicose, sendo que em um dos tubos é adicionado óleo estéril até formar uma coluna de um centímetro de altura. Em bactérias que fazem oxidação da glicose, o tubo sem o óleo adquire coloração amarela e o tubo com óleo permanece azul ou verde, pois essas bactérias são, em geral, aeróbias estritas. Em bactérias fermentadoras de

glicose, os dois tubos adquirem coloração amarela, pois, normalmente, essas bactérias são anaeróbias facultativas. O teste é considerado não reativo quando os dois tubos permanecem verdes ou azuis. Os tubos devem ser incubados na estufa de cultivo microbiológico a 37°C por até 14 dias (OLIVEIRA, 2000). A figura 6 demonstra os possíveis resultados para o teste de OF: fermentativo, oxidativo e não reativo, da esquerda para direita.

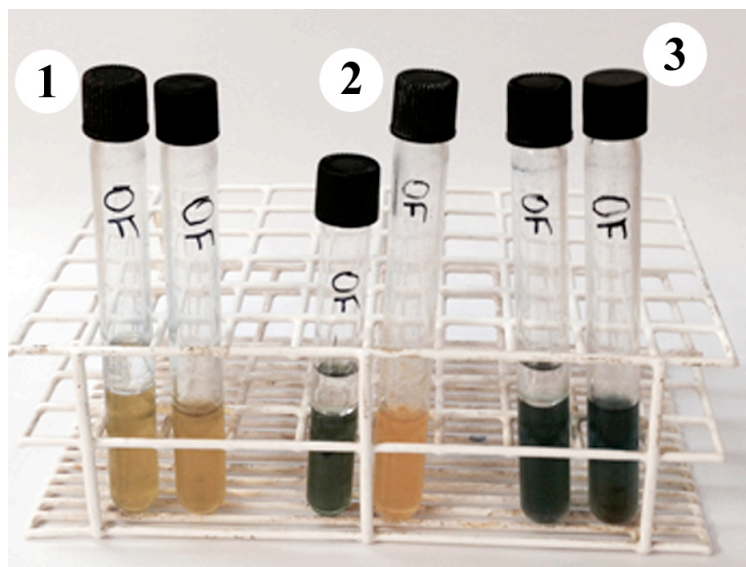


Figura 10 - Possíveis resultados para o teste de Hugh e Leifson: fermentativo (1), oxidativo (2) e não-reativo (3).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.6. Teste de indol

O teste de indol demonstra se a bactéria possui a enzima triptofanase, que realiza a clivagem do triptofano, produzindo, indol, ácido pirúvico e amônia (KONEMAN et al., 2001). A bactéria é inoculada em um caldo nutritivo contendo 1% de triptofano e incubada por quarenta e oito horas. Adiciona-se 1 ml de éter ou xilol ao tubo e, em sequência, 0,5 ml de reativo de Erlich. O resultado positivo é indicado pela formação de um anel vermelho abaixo da coluna de éter ou xilol. Pode-se utilizar como a *Escherichia coli* como controle positivo e *Salmonella* spp., como negativo (OLIVEIRA, 2000). A figura 7 evidencia os resultados negativo (à esquerda) e positivo (à direita).

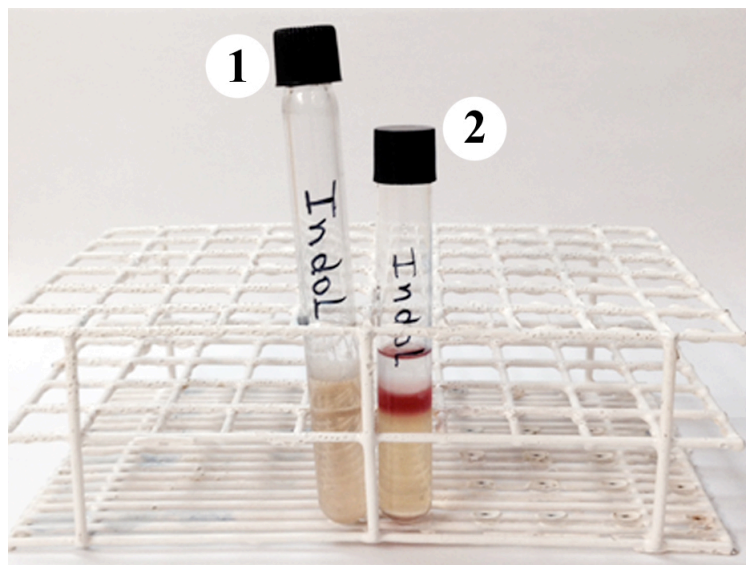


Figura 11 - Resultados negativo (1) e positivo (2) para o teste de indol.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.7. Teste de vermelho de metila (VM)

O teste de vermelho de metila indica se a bactéria produz ácidos fortes a partir do metabolismo da glicose. O pH de 4,4 é o ponto ácido limite do indicador vermelho de metila, sendo assim, quando o pH do meio é menor de 4,4 visualiza-se uma coloração avermelhada (KONEMAN et al., 2001). A colônia bacteriana é inoculada no meio de Clark Lubs (meio VM-VP) por vinte e quatro a quarenta e oito horas. O resultado positivo é obtido quando o meio adquire coloração avermelhada ao se adicionar o indicador vermelho de metila (OLIVEIRA, 2000). A figura 8 mostra os resultados negativo (à esquerda) e positivo (à direita) para o teste de vermelho de metila.

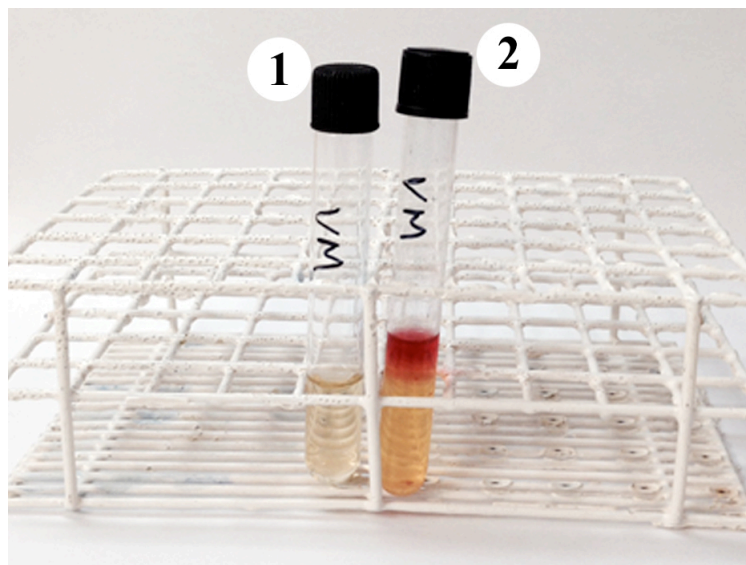


Figura 12 - Resultados negativo (1) e positivo (2) no teste de VM.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.8. Teste de Vogues Prokauer (VP)

O teste de Vogues Prokauer indica a produção de acetilmetilcarbinol (OLIVEIRA, 2000). A acetoína (acetilmetilcarbinol) é convertida em diacetil, através da ação do hidróxido de potássio e do oxigênio atmosférico e adquire coloração vermelha sob a ação catalítica do α -naftol (KONEMAN et al., 2001). O procedimento para o teste consiste em inocular e incubar a bactéria em meio VM-VP por quarenta e oito horas e, posteriormente, adicionar 0,6 ml de solução de α -naftol a 5% e 0,2 ml de solução aquosa de hidróxido de potássio a 40%, contendo 0,3% de creatina e posicionar o tubo inclinado, para aumentar a superfície de contato com o ar. O resultado obtido é positivo quando, após quinze minutos, observa-se uma coloração vermelha intensa. Pode-se utilizar a *Klebsiella pneumoniae* como controle positivo e *Escherichia coli* como negativo (OLIVEIRA, 2000). A figura 9 evidencia os resultados negativo (abaixo) e positivo (acima) para o teste de VP.

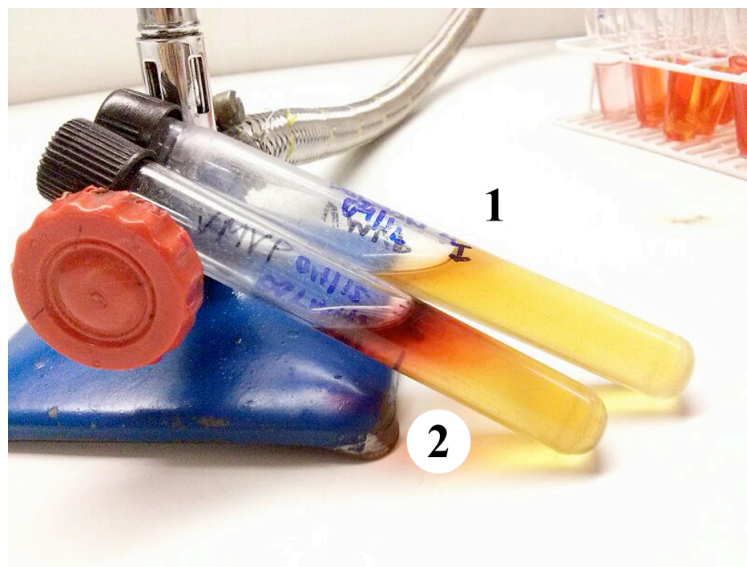


Figura 13 – Resultados negativo (1) e positivo (2) para o teste de VM.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.9. Teste de citrato

O teste de citrato determina se o microrganismo é capaz de usar o citrato de sódio como única fonte de carbono para o metabolismo e crescimento (KONEMAN et al., 2001). O teste é feito estriando-se uma alçada da colônia no meio Citrato de Simmons e o resultado é considerado positivo, se houver alteração da cor original do meio (verde) para azul. Como controle positivo, pode-se usar *Klebsiella pneumoniae* e, como negativo, *Escherichia coli* (OLIVEIRA, 2000). A figura 10 demonstra os resultados positivo (1) e negativo (2) para o teste de citrato.

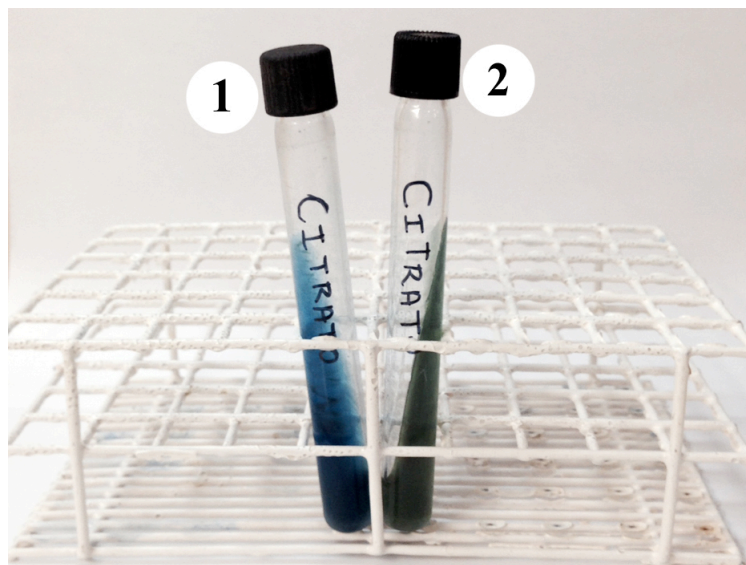


Figura 14 - Resultados positivo (1) e negativo (2) no teste de citato.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.10. Teste de ágar TSI

O teste de TSI (*Triple Sugar Iron*) indica se a bactéria fermenta somente glicose, se fermenta glicose, lactose e sacarose e se produz sulfeto de hidrogênio (ANVISA). Também pode-se observar a produção de gás (OLIVEIRA, 2000). O meio ágar TSI contém 0,1% de glicose, 0,1% de lactose, 0,1% de sacarose, vermelho de fenol, para a detecção de fermentação de carboidratos, e sulfato de ferro, para indicar a produção de sulfeto de hidrogênio (ANVISA). O teste é feito inoculando a colônia perfurando o ágar até o fundo do tubo com a agulha e, em seguida, estriando sobre a superfície em bisel. O tubo deve ser incubado por sete dias e observado diariamente, para verificar se houve produção de H_2S . Pode-se obter as seguintes conclusões:

- A bactéria fermenta glicose: observa-se coloração amarela no fundo do tubo (reação ácida) e vermelha na superfície (reação alcalina);
- A bactéria fermenta glicose, sacarose e lactose: observa-se coloração amarela em toda a extensão do tubo (reação ácida);
- A bactéria produz sulfato de hidrogênio (H_2S): observa-se coloração negra no fundo do tubo;
- A bactéria produz gás: observa-se a formação de bolhas de gás no fundo do tubo.

A figura 11 mostra, da esquerda para a direita, testes de TSI com fermentação dos três açúcares, formação de H_2S e produção de gás.

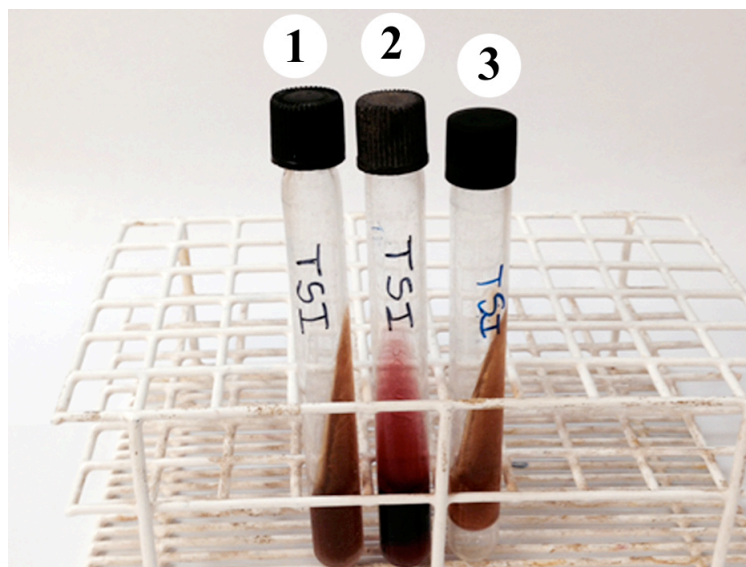


Figura 15 - Testes de TSI com fermentação dos três açúcares (1), formação de sulfato de hidrogênio (2) e produção de gás (3).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.11. Testes de fermentação de açúcares

Os testes de fermentação de açúcares determinam a capacidade da bactéria de fermentar determinados açúcares, produzindo ácido ou ácido e gás. Com exceção da salicina, adicionada na proporção de 0,5%, os demais açúcares são adicionados na proporção de 1%. Nos tubos com glicose são introduzidos tubos de Durham em posição invertida, para detectar a produção de gás. Os principais açúcares usados no laboratório são: glicose, lactose, sacarose, manitol, salicina, rafinose, rhaminose, arabinose, maltose, trealose, xilose, entre outros. Como indicadores de pH, utiliza-se vermelho fenol ou Indicador de Andrade. Os tubos inoculados são incubados por dezoito a vinte e quatro horas e o resultado é considerado positivo se houver alteração na coloração original (OLIVEIRA, 2000). A figura 12 evidencia os resultados negativo (à esquerda) e positivo (à direita) no teste de fermentação da trealose, usando o indicador de Andrade como indicador de pH.

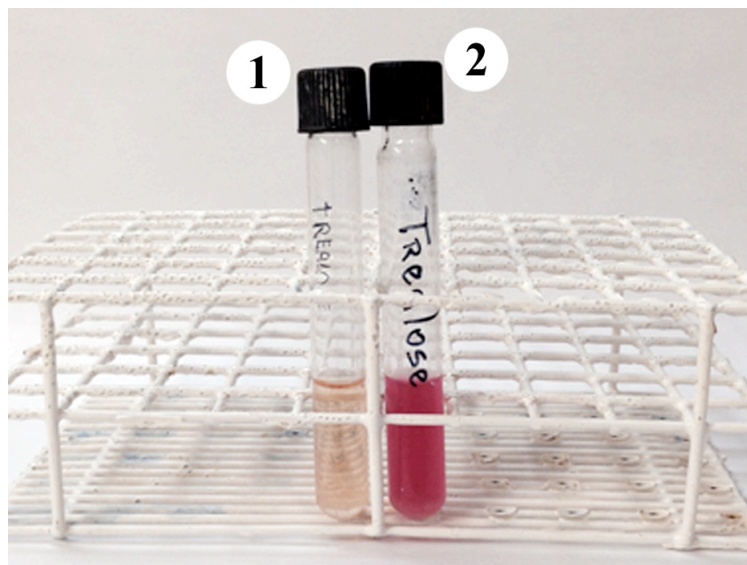


Figura 16 - Resultados negativo (1) e positivo (2) no teste de fermentação da trealose, utilizando o indicador de Andrade como indicador de pH.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.12. Testes de descarboxilação de aminoácidos

Os testes de descarboxilação de aminoácidos indicam se a bactéria é capaz de degradar lisina, ornitina ou arginina, produzindo, respectivamente, as aminas: cadaverina, putrescina e citrulina. O indicador de pH utilizado é o púrpura de bromocresol, que apresenta-se roxo em pH alcalino e amarelo em pH ácido (KONEMAN et al., 2001). O procedimento para o teste consiste em inocular e incubar por quatro dias dois tubos, um contendo glicose e o aminoácido em questão e o outro contendo apenas glicose (controle), sendo que ambos os tubos contêm 1 a 1,5 ml de óleo estéril. Os dois tubos devem se tornar amarelos, devido à acidificação do pH decorrente da fermentação da glicose e considera-se o resultado positivo se, posteriormente, o tubo contendo o aminoácido adquirir coloração roxa, devido à alcalinização do pH, pelo descarboxilação do aminoácido (OLIVEIRA, 2000). A figura 13 mostra o controle (à esquerda) e resultado positivo (à direita) para o teste de descarboxilação da lisina.

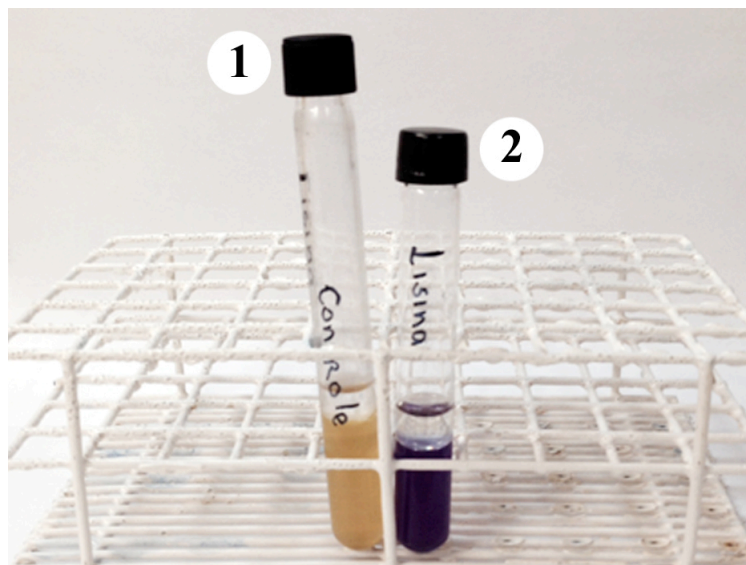


Figura 17 - Controle (1) e resultado positivo (2) no teste de descarboxilação da lisina.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.2.13. Método de fita adesiva para identificação de fungos dermatófitos

O método da fita adesiva é feito pressionando uma fita de celofane transparente de maneira firme e suave sobre a superfície da colônia. A fita é, então, depositada sobre uma gota de corante azul-de-algodão de lactofenol, em uma lâmina de vidro (KONEMAN et al., 2001). Pode-se utilizar também o corante azul de metileno. Esse método permite a visualização de hifas, microconídeos, macroconídeos e outras estruturas e permite o estabelecimento do diagnóstico positivo para fungos dermatófitos com a presença de macroconídeos. A lâmina é visualizada no microscópio óptico com aumento de 400x. A figura 15 evidencia uma lâmina feita através do método da fita adesiva, usando os corantes azul de metileno (à esquerda) e azul-de-lactofenol (à direita).

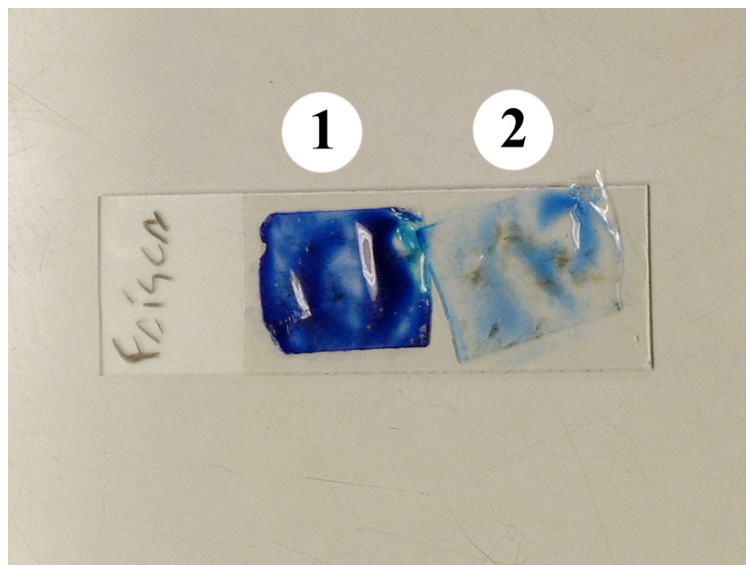


Figura 18 - Lâmina preparada utilizando o método da fita adesiva. Foram usados os corantes azul de metileno (1) e azul-de-algodão de lactofenol (2).

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.3. Antibiógramas (método de difusão por disco ou Kirby Bauer)

Nesse método são usados papel de filtro impregnados com antibióticos. O diâmetro da zona de inibição é influenciado pela difusão da droga no ágar e permite classificar as bactérias como susceptíveis, intermediárias ou resistentes pela sua mensuração a partir dos centros dos discos (OLIVEIRA, 2000).

Uma suspensão bacteriana é inoculada em uma placa de ágar Müller Hinton® ou Müller Hinton® Sangue com um swab estéril. Deve-se assegurar que o inóculo foi distribuído por toda a extensão da placa, esfregando o swab na superfície do ágar três vezes e girando a placa cerca de sessenta graus entre cada inoculação. Em seguida, os discos são distribuídos com auxílio de uma pinça estéril, mantendo a distância mínima de 24mm entre os centros de cada disco. As placas são incubadas na estufa de cultivo microbiológico por dezoito e examinadas (OLIVEIRA, 2000). As figuras 16 e 17 mostram um antibiograma, respectivamente, antes e depois de incubado na estufa para cultivo microbiano por vinte e quatro horas.



Figura 19 - Antibiograma antes de ser incubado na estufa de cultivo microbiológico por vinte quatro horas.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho



Figura 20 - Antibiograma após vinte e quatro horas de incubação na estufa de cultivo microbiológico.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.4. Bactérias mais frequentemente identificadas na rotina do laboratório

As bactérias mais comuns isoladas e identificadas no laboratório no período de 19 de agosto de 2013 a 15 de novembro de 2013 foram: *Staphylococcus* spp. (35,94%), *Streptococcus* spp. (10,94%), *Escherichia coli* (9,38%) e *Corynebacterium* spp. (9,38%).

3.4.1. *Staphylococcus* spp.

São cocos Gram-positivos, catalase-positivos, oxidase-negativos e, em sua maioria, anaeróbios facultativos. Têm cerca de 1µm de diâmetro e tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Podem ocorrer como comensais da pele e mucosas e como oportunistas, causando infecções piogênicas (QUINN et al., 2005).

Formam colônias redondas, com bordos irregulares e pigmentadas de branco ou amarelo. Algumas amostras de *Staphylococcus aureus* podem produzir beta hemólise em ágar sangue® (OLIVEIRA, 2000). A figura 18 mostra uma lâmina, preparada pela coloração de Gram, de uma colônia de *Staphylococcus* spp, visualizada no microscópio óptico em aumento de 1000x.

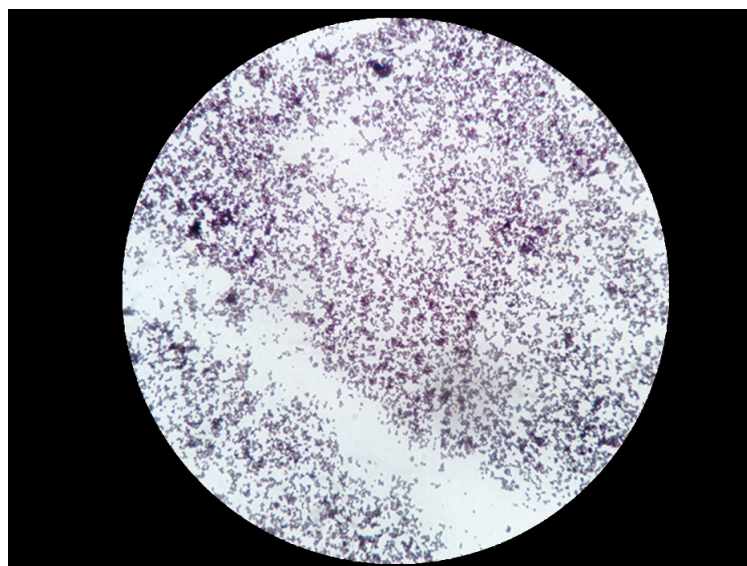


Figura 21 - Lâmina de *Staphylococcus* spp. preparada com coloração de Gram, visualizada no microscópio óptico em aumento de 1000x.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.4.2. *Streptococcus* spp.

São cocos Gram-positivos, catalase-negativos, oxidase-negativos e anaeróbios facultativos. Têm cerca de 1µm de diâmetro e formam cadeias de diferentes comprimentos. São bactérias fastidiosas, portanto, requerem adição de sangue ou soro em seu meio de cultura. Podem causar infecções supurativas como mastite, metrite, poliartrite e meningite (QUINN et al., 2005).

Formam colônias pequenas após vinte e quatro horas de incubação, podendo ou não haver hemólise (OLIVEIRA, 2000).

3.4.3. *Escherichia coli*

Pertence à família *Enterobacteriaceae*, portanto, são bastonetes Gram-negativos, catalase-positivos, oxidase-negativos e fermentativos (QUINN et. al., 2005). Podem ter efeito patogênico no intestino, provocando diarreia, e algumas amostras produzem enterotoxinas (OLIVEIRA, 2000).

Crescem em ágar MacConkey[®] com coloração rosa e em ágar EMB[®] as colônias são pretas e apresentam brilho verde metálico (OLIVEIRA, 2000).

3.4.4. *Corynebacterium* spp.

São bastonetes corineformes, Gram-positivas, catalase-positivas, oxidase-negativas e anaeróbios facultativos. Normalmente, requerem meios enriquecidos para seu crescimento. Se agrupam em paliçadas de células paralelas ou anguladas, formando grupos semelhantes à letras chinesas. Podem causar lesões supurativas (QUINN et. al., 2005). A *C. equi* pode causar pneumonia, aborto e metrite, em equinos, e lesões tuberculóides em gânglios linfáticos da cabeça de suínos, enquanto a *C. pseudotuberculosis* pode causar linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos e lifangite supurativa em equinos (OLIVEIRA, 2000).

Formam colônias pequenas e de coloração clara ou translúcidas. Colônias de *C. equi* normalmente são hemolíticas e colônias de *C. pseudotuberculosis* em três dias adquirem coloração alaranjada, podendo também produzir hemólise (OLIVEIRA, 2000). A figura 19 mostra uma lâmina de *Corynebacterium* spp. preparada com coloração de Gram, visualizada no microscópio óptico em aumento de 1000x.

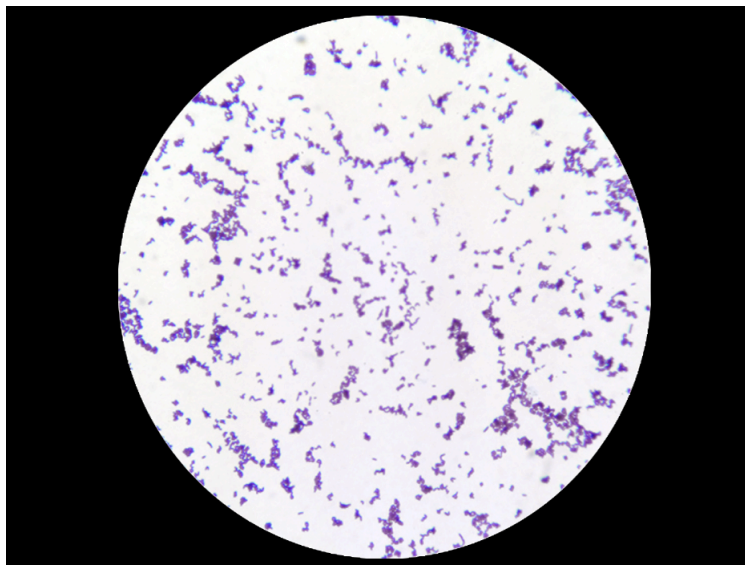


Figura 22 - Lâmina de *Corynebacterium* spp. preparada com coloração de Gram, visualizada no microscópio óptico em aumento de 1000x.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.5. Fungos mais frequentemente identificados na rotina do laboratório

No período de 19 de agosto de 2013 a 15 de novembro de 2013 foi identificada uma amostra contendo fungo dermatófito e uma contendo *Malassezia pachydermatis*.

3.5.1 Fungos dermatófitos

São fungos patogênicos com afinidade por estruturas queratinizadas, portanto, instalam-se na pele, pelos e unhas. São estritamente aeróbios, crescem lentamente em laboratório, muitas vezes, produzindo colônias pigmentadas. A identificação do fungo dermatófito é feita através da morfologia da colônia e do tipo de macroconídeo produzido. Dermatofitoses são doenças zoonóticas, sendo que a maioria das infecções no homem é causada pelo *Microsporum canis* (QUINN et. al., 2005). A figura 20 mostra macroconídeos de *Microsporum canis* corados com azul-de-algodão de lactofenol, visualizada no microscópio óptico em aumento de 400x.

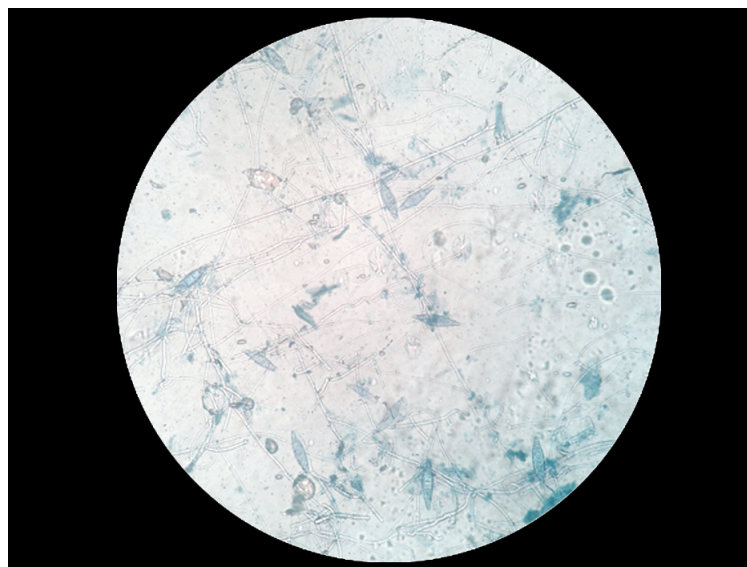


Figura 23 - Macroconídeos de *Microsporium canis* corados com azul-de-algodão de lactofenol, visualizada no microscópio óptico em aumento de 400x.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

3.5.2. *Malassezia pachydermatis*

São leveduras aeróbias, não-fermentadoras, comensais na pele de animais e humanos, mais facilmente encontradas em áreas com glândulas sebáceas. Suas células têm formato de garrafa e se reproduzem por brotamento. A *M. pachydermatis* é o único membro do gênero que cresce em ágar Sabouraud® sem suplementação de lipídeos. Suas colônias são lisas, opacas e com coloração creme (QUINN et. al., 2005). A figura 21 mostra uma lâmina de *Malassezia pachydermatis* preparada com coloração de Gram, visualizada no microscópio óptico em aumento de 1000x.

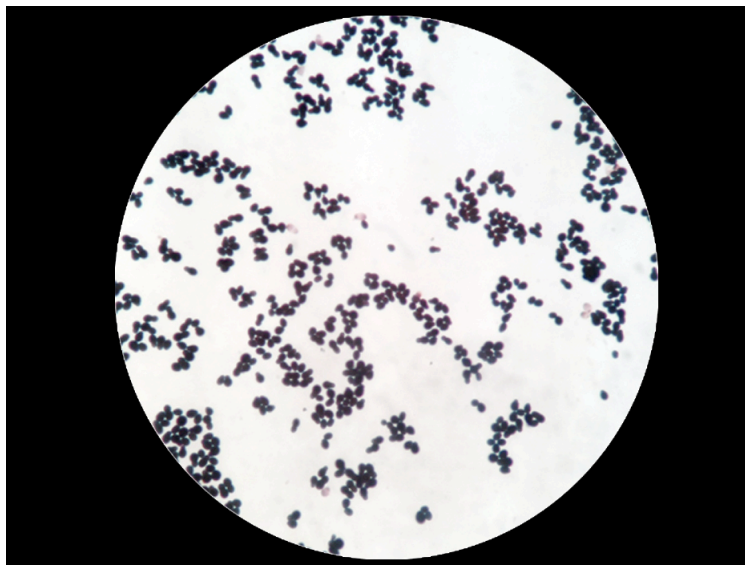


Figura 24 - Lâmina de *Malassezia pachydermatis* preparada com coloração de Gram, visualizada no microscópio óptico em aumento de 1000x.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

4. Rotina do laboratório

No Setor de Bacteriologia e Micologia são recebidas amostras oriundas de suspeitas de infecção fúngica ou bacteriana. As amostras são recebidas acondicionadas individualmente em recipientes esterilizados, identificados e acompanhados da Ficha de Identificação. Essa ficha contém informações sobre o animal, tipo de material coletado e local de origem da amostra. Os tipos de amostras recebidas são: aspirado ou lavado, urina, swab, fragmentos de necropsia, pêlos, biópsia, leite e outros. *Pools* de amostras e amostras que não atendam às condições de acondicionamento são devolvidas ao portador ou descartadas (POP-04_00).

No período de 19 de agosto de 2013 a 15 de novembro de 2013 o laboratório recebeu amostras de 83 animais, sendo 28 para análise bacteriológica e fúngica, 34 somente para análise bacteriológica e 21 somente para análise fúngica. Desses animais foram analisadas 124 amostras: 54 swabs, 21 amostras de pelo, 15 amostras de urina, 7 aspirados/lavados, 3 raspados de pele, 3 amostras de leite, 2 fragmentos de necropsia, 1 biópsia e 3 amostras de outros tipos. Das 15 amostras de urina recebidas, 1 foi usada para cultura bacteriológica e 14 para pesquisa de *Leptospira* spp. no microscópio de campo escuro.

Das 62 amostras suspeitas de infecção bacteriana, foram isoladas 64 bactérias e feitos 28 antibiogramas. As bactérias isoladas e identificadas foram, em ordem decrescente de recorrência: 23 *Staphylococcus* spp., 7 *Streptococcus* spp., 6 *Escherichia coli* e 6 *Corynebacterium* spp., 5 *Bacillus* spp. e 17 culturas de outras bactérias, como mostra a figura 25.

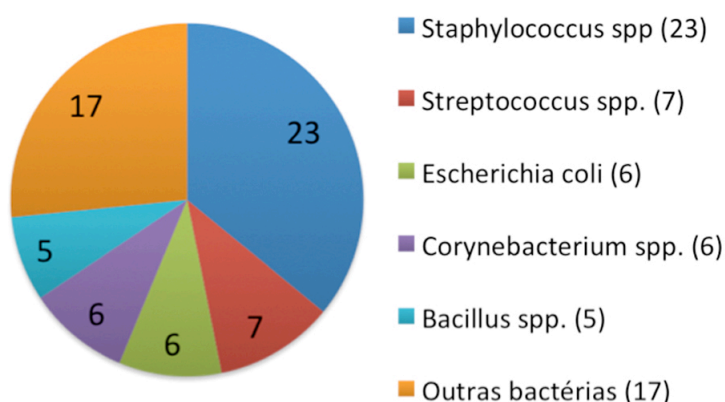


Figura 25 - Bactérias mais frequentemente isoladas.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

Em 17 amostras não houve crescimento em ágar sangue[®]. Com relação ao exame direto para pesquisa de *Leptospira* spp. no microscópio de campo escuro, foi obtido resultado positivo em 2 das 14 amostras de urina.

Nas 49 amostras suspeitas de infecção fúngica foram obtidos os seguintes resultados: 16 apresentaram ausência de crescimento fúngico, em 31 não houve crescimento de fungos dermatófitos, em 1 amostra foi visualizado macroconídeos de *Microsporum canis* e em 1 houve crescimento de *Malassezia* spp, como apontado na figura 26.

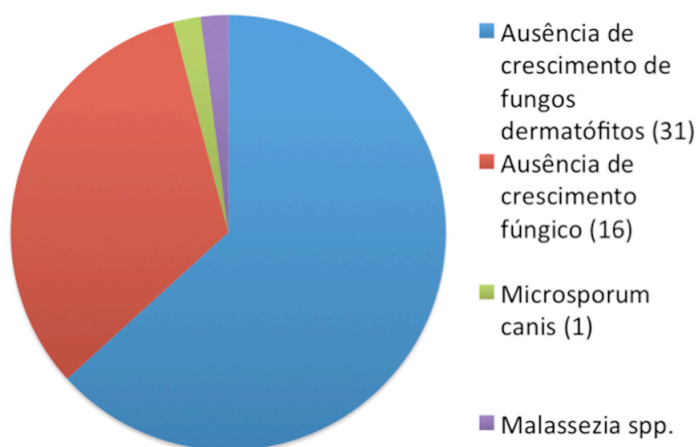


Figura 26 - Amostras de infecção fúngica.
Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

4.1. Inoculação e incubação de amostras

Os recipientes contendo as amostras devem ser manipulados sobre a bancada previamente desinfetada com álcool 70% e as amostras devem ser abertas e inoculadas próximas à chama do bico de Bunsen. Deve-se, também, lavar as mãos e realizar a assepsia com álcool 70% antes e depois de manipular as amostras e usar luvas para manipular materiais que apresentem maior risco biológico.

A inoculação da amostra no meio de cultura depende de sua apresentação:

- Aspirados, lavados e urina para cultura bacteriológica: a amostra deve ser homogeneizada e, em seguida, deposita-se uma gota (33 microlitros) na placa de ágar sangue[®]. Deve-se estriar a amostra depositada na placa com auxílio de uma alça bacteriológica previamente flambada. A placa e o caldo são levados à estufa de cultivo microbiológico a 37°C por vinte e quatro a quarenta e oito horas.

- Leite: amostras de leite devem ser incubadas *overnight* na estufa a 37°C e inoculadas na placa de agar sangue[®], depositando-se uma gota (33 microlitros) e entriando-se com a alça bacteriológica.

- Biópsias: a amostra é estriada, com auxílio de uma pinça previamente flambada diretamente sobre a placa de agar sangue[®], para cultura bacteriana, ou de agar Sabouraud[®], para cultura fúngica. Pode-se, também, usar um swab da amostra para estriar a placa de agar sangue[®]. As placas são levadas à estufa de cultivo microbiológico a 37°C, sendo que a placa de agar sangue[®] é incubada por vinte e quatro a quarenta e oito horas. O tempo de incubação da placa de agar Sabouraud[®] dependerá da suspeita clínica.

- Fragmentos oriundos de necropsia: a amostra é posta sobre uma bandeja de aço inoxidável previamente autoclavada e sua superfície flambada com o bico de Bunsen. Faz-se uma incisão no fragmento usando uma lâmina de bisturi estéril e coleta-se um esfregaço do interior da amostra com um swab. Esse swab é estriado em uma placa de agar sangue[®]. A placa e o caldo são levados à estufa de cultivo microbiológico a 37°C por vinte e quatro a quarenta e oito horas.

- Pelos e raspados de pele: para isolamento de bactérias, a amostra é estriada diretamente sobre a placa de agar sangue[®], utilizando uma pinça previamente flambada. Para cultura fúngica, a amostra é depositada sobre uma placa de agar Mycosel[®], em caso de suspeita de dermatofitose, ou estriada sobre uma placa de agar Sabouraud[®], para pesquisa de fungos não dermatófitos. As placas de agar sangue[®] são levadas à estufa de cultivo microbiológico a 37°C por vinte e quatro a quarenta e oito horas, as de agar Sabouraud[®] são incubadas por até 7 dias na estufa a 37°C e as de agar Mycosel[®] são mantidas à temperatura ambiente por, pelo menos, 15 dias.

- Swabs de lesões, órgãos e fezes: o swab é estriado diretamente sobre uma placa de agar sangue[®]. A placa e o caldo são levados à estufa de cultivo microbiológico por vinte e quatro a quarenta e oito horas.

- Swabs de ouvido: o swab deve ser estriado diretamente sobre uma placa de agar sangue[®], para pesquisa de bactérias, ou na de Sabouraud[®], para pesquisa de *Malassezia* spp., e, posteriormente, descartado. As placas são levadas à estufa de cultivo microbiológico, sendo que a placa de agar sangue[®] é incubada por vinte e quatro a quarenta e oito horas e a de agar Sabouraud[®], por até 7 dias.

Amostras suspeitas de infecções por bactérias anaeróbias são incubadas dentro da jarra de anaerobiose. *Actinomyces bovis*, *Campylobacter mucosalis* e espécies de clostrídios, fusobactérias e bacterióides são incubadas dessa maneira. Amostras suspeitas de bactérias

microaerófilas, por sua vez, são incubadas na jarra de microaerofilia, que proporciona uma atmosfera com 5% a 10% de CO₂. *Campylobacter jejuni*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinomyces viscosus* e *Brucella* spp. são considerados microaerófilos (QUINN et al., 1994). A figura 27 mostra uma jarra de microaerofilia antes de ser tampada e vedada.



Figura 27 - Jarra de microaerofilia aberta.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

4.2. Urina para pesquisa de *Leptospira* spp.

É um exame direto, portanto, a amostra de urina não é inoculada em meio de cultura. Deposita-se uma gota de urina sobre uma lâmina e coloca-se um lamínula sobre ela. Essa lâmina é examinada no microscópio de campo escuro e, em seguida, descartada. O exame é considerado positivo se for visualizada *Leptospira* spp.

4.3. Isolamento e repique de amostras bacterianas

Após o período de incubação, faz-se a observação das características macroscópicas das colônias presentes na placa, visualizando a superfície do ágar em diversas inclinações sob a incidência direta de luz artificial e, se necessário, utilizar transiluminação para detectar colônias hemolíticas. Durante essa inspeção visual, o microbiologista deve identificar colônias morfologicamente diferentes entre si (KONEMAN et al., 2001). Se houver mais de um tipo de colônia na placa é preciso fazer o repique das colônias isoladas ou isolamento, se as colônias com características diferentes estiverem muito próximas ou juntas. O repique

também é feito para aumentar a biomassa de células bacterianas ou para transferir uma colônia para um novo meio de cultura.

Repique: a transferência é feita coletando uma alçada da cultura pura, com a alça previamente flambada, e inoculando-a no meio de cultura desejado (SILVA; OLIVEIRA, 2007).

Isolamento: as colônias são semeadas em uma nova placa até o esgotamento do inóculo, ou seja, ele é progressivamente diluído de modo a obter-se células isoladas que originarão colônias puras (SILVA; OLIVEIRA, 2007). Esse esgotamento é feito estriando uma alçada das colônias na placa, em seguida, a alça é flambada e faz-se uma nova estria a partir do final dessa primeira estria. Faz-se mais uma ou duas estrias a partir da estria feita anteriormente, flambando-se a alça antes de cada nova estria. Na figura 28 esquematiza o esgotamento do inóculo no procedimento de isolamento.

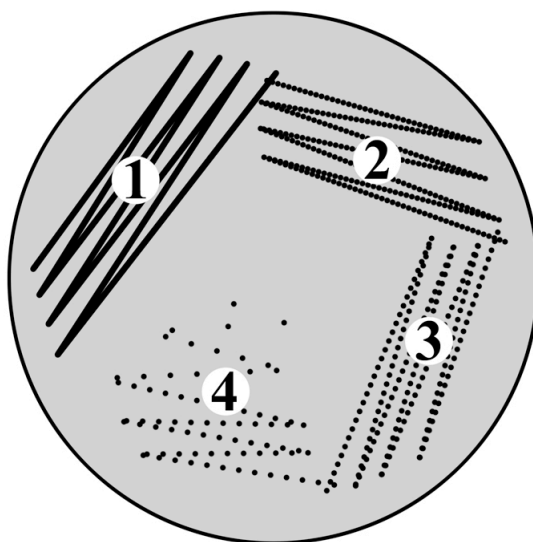


Figura 28 - Esquematização do esgotamento do inóculo no isolamento. Na figura estão indicadas com números a primeira (1), segunda (2), terceira (3) e quarta (4) estrias feitas com a alça.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

Após os procedimentos de repique e isolamento, os meios de cultura devem ser novamente incubados por vinte e quatro a quarenta e oito horas.

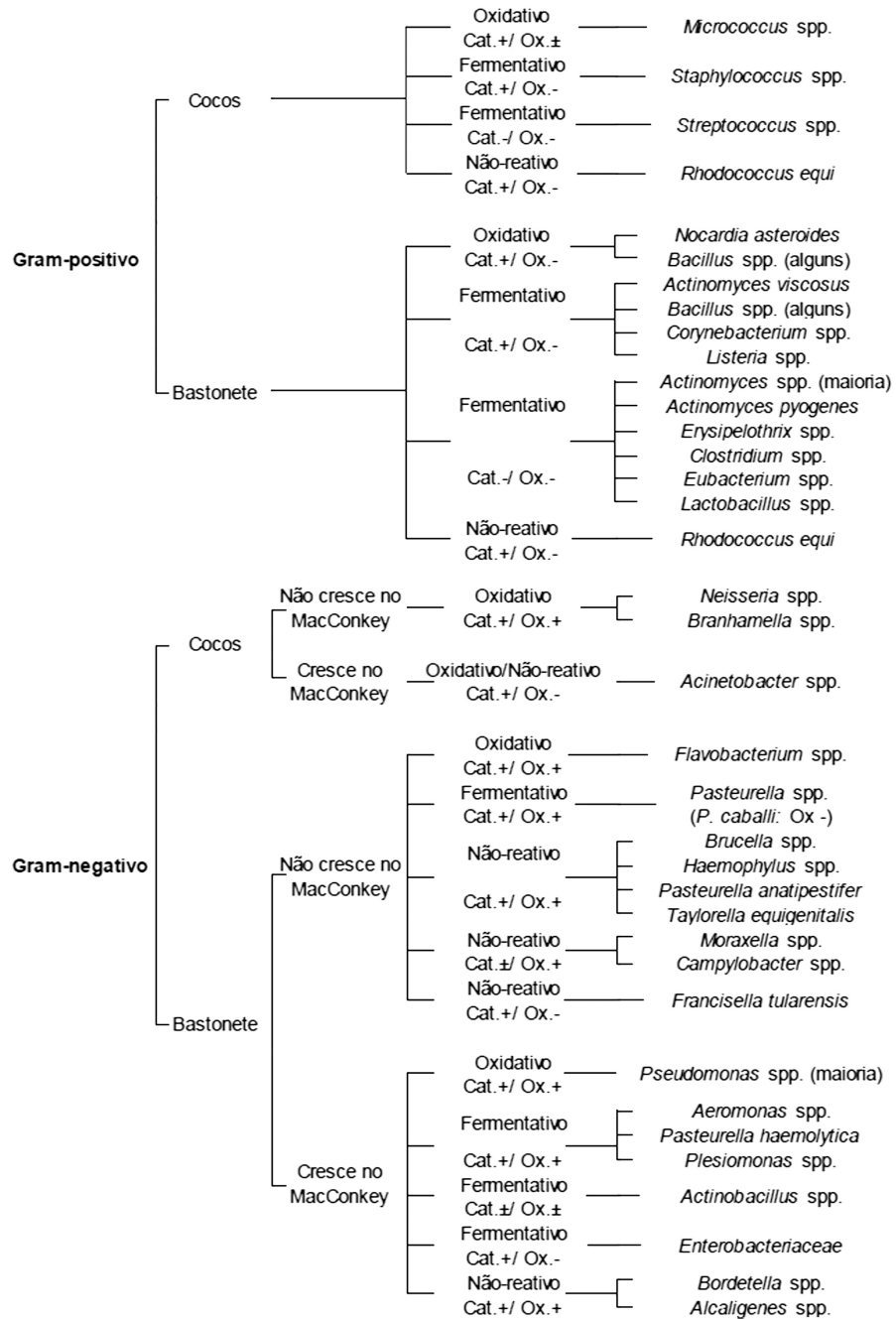
4.4. Identificação de bactérias

A partir da inspeção inicial das bactérias isoladas, isto é, da observação de das características macroscópicas das colônias e sua ação no meio de cultura e considerando

também características como o odor da colônia e origem do material, pode-se fazer a identificação preliminar das bactérias (KONEMAN et al., 2001).

Em seguida, deve-se fazer a coloração de Gram e o teste de KOH. Na coloração de Gram é possível determinar se a bactéria em questão é um coco ou um bastonete e o teste de KOH indica se a bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa. Faz-se, também, os testes de Hugh e Leifson (meio O-F), catalase e oxidase. Bactérias Gram-negativas são também inoculadas em ágar McConkey[®].

A partir dos resultados desses testes, utiliza-se a tabela adaptada de QUINN et al., 1994, para dar sequência à identificação, representada na figura 29.



Fonte: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. Dublin: Wolfe, 1994, 648p.

Figura 29 - Tabela adaptada de QUINN et al., 1994, para identificação de bactérias.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

Através dessa tabela, muitos gêneros bacterianos podem ser identificados somente com a coloração de Gram e os testes de KOH, O-F, catalase e oxidase, como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Micrococcus* spp.

Outras bactérias necessitam da realização de mais testes bioquímicos, como os membros da família *Enterobacteriaceae* (bastonetes Gram negativos, crescem em ágar

McConkey[®], fermentativos, catalase positivos e oxidase negativos). Nesse caso, para dar sequência à identificação, são utilizados testes como os de indol, VM, VP, citrato, descarboxilação de aminoácidos, fermentação de açúcares, entre outros.

4.5. Antibiógrama

Após isolada e identificada, a bactéria pode ser inoculada em caldo para antibiógrama. Na rotina do laboratório, faz-se a inoculação de três colônias isoladas em um caldo contendo açúcar, como sacarose, manitol, salicina, rafinose, entre outros, ou em caldo BHI. Esse caldo é homogeneizado no vortex, inoculado com um swab em ágar Müller Hinton[®] ou Müller Hinton[®] Sangue e, posteriormente, posicionam-se os discos de antibióticos.

4.6. Inoculação e incubação de amostras fúngicas e identificação de fungos

As amostras de fungo são recebidas acondicionadas individualmente em recipientes estéreis e inoculadas, próximas à chama do bico de Bunsen. Amostras suspeitas de dermatofitoses são inoculadas em ágar Mycosel[®] e outras suspeitas, como swabs otológicos de amostras com suspeita de *Malassezia pachydermatis*, são inoculadas em ágar Sabouraud[®].

Amostras inoculadas em Mycosel[®] são incubadas à temperatura ambiente e podem ser examinadas após quinze a vinte e um dias. Faz-se, primeiramente, a observação das características macroscópicas das colônias. Fungos dermatófitos, em geral, produzem hifas delgadas e com aspecto de teia de aranha ou cabelos entrelaçados. O diagnóstico é confirmado com a visualização de macroconídeos na microscopia óptica.


Swabs otológicos são inoculados em placas de ágar Sabouraud[®] e estas são incubadas na estufa de cultivo microbiológico por até sete dias. O diagnóstico é confirmado com a análise da lâmina corada com coloração de Gram no microscópio óptico no aumento de 1000x.

4.7. Emissão de laudos

O resultado do exame microbiológico é entregue para o proprietário ou veterinário responsável pela coleta do material no formato de laudos, que contêm as seguintes informações: nome do veterinário responsável pela coleta, identificação do animal (nome,

idade, raça sexo e RG, se o animal for paciente do Hospital Veterinário da UnB), nome do proprietário, exames solicitados e data de entrega do laudo.

Nos laudos bacteriológicos, além dos microrganismos isolados e a tabela com os resultados dos antibiogramas, caso tenha sido solicitado. Se não houver crescimento em ágar sangue[®] após 48 horas de incubação, deve-se informar no laudo. A figura 30 mostra um exemplo de laudo bacteriológico onde foram isolados *Escherichia coli* e *Proteus* spp. e seus respectivos antibiogramas.



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária

Cultura, Isolamento e Antibiograma.

Responsável pela coleta: _____
 Identificação: _____ RG: _____
 Espécie: _____ Raça: _____
 Idade: _____ Sexo: _____
 Proprietário: _____
 Material para análise: _____
 Exame solicitado: Cultura, Isolamento e Antibiograma.
 Data da entrega: _____

Resultado

Microrganismos isolados: *Escherichia coli*, *Proteus* spp.

Antibiograma

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> spp.
Amicacina	Sensível	Sensível
Amoxicilina+ Ac.clav.	Sensível	Intermediário
Enrofloxacin	Sensível	Resistente
marbofloxacin	Sensível	Resistente
Nitrofurantoina	Intermediário	Resistente
Penicilina	Resistente	Resistente
Cefalotina	Resistente	Resistente
Ampicilina	Resistente	Resistente
Sulfonamidas	Resistente	Resistente
Oxacilina	Resistente	Resistente

Figura 30 - Exemplo de laudo bacteriológico no qual foram isolados *Escherichia coli* e *Proteus* spp. e com seus respectivos antibiogramas.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

Nos laudos fúngicos deve-se informar o microrganismo identificado. Deve-se informar também se observar o crescimento de fungos ambientais, se houve ou não crescimento de fungos patogênicos ou se não houve crescimento fúngico. A figura 31 mostra um exemplo de laudo fúngico ou com ausência de crescimento.



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária

Cultura e Isolamento.

Veterinário responsável: [Redacted]
Identificação: [Redacted]
Espécie: [Redacted]
Idade: [Redacted]
Proprietário: [Redacted]
Material para análise: [Redacted]
Exame solicitado: Cultura e Isolamento.
Data da entrega: [Redacted]

RG: [Redacted]
Raça: [Redacted]
Sexo: [Redacted]

Resultado

Ausência de crescimento de fungos dermatófitos.

Figura 31 - Exemplo de laudo fúngico com ausência de crescimento.

Fonte: Arquivo Pessoal/Luis Carlos Pires Rayol Filho

5. Considerações finais

O período de estágio supervisionado no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília possibilitou uma maior compreensão teórica e prática da importância do diagnóstico microbiológico para a medicina veterinária. O acompanhamento das atividades de rotina do laboratório foram importantes para aprofundar os conhecimentos de microbiologia, aprendidos no decorrer da graduação, bem como de outras disciplinas relacionadas à prática laboratorial, como citologia e bioquímica, além de explicitar os conceitos de biossegurança, aplicados no laboratório.

Foi possível, também, compreender a importância dos procedimentos que precedem a análise microbiológica, como o acondicionamento adequado das amostras, e da suspeita clínica. Esses fatores irão influenciar consideravelmente a identificação preliminar dos microrganismos e a qualidade do exame microbiológico.

6. Referências bibliográficas

BIOBRÁS DIAGNÓSTICOS. **Catálogos de Meios de Cultura. Biobrás SA.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos.** Módulo 4. 2004. Disponível no site http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf. Acesso em 27 de Novembro de 2013.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D; JANDA, W. M; SCHRECKENBERGER, P. C; WINN, W. C, JR. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido.** Quinta edição. Medsi, 2001.

MBIOLOG DIAGNÓSTICOS. **Instruções de Uso Caldo BHI – Mbiolog.** 2010. Disponível em http://www.mbiolog.com.br/produtos/Caldo_BHI.pdf. Acesso em 27 de Novembro de 2013.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária Guia Bacteriológico Prático.** 2ª edição. EDITORA DA ULBRA. Canoas, 2000.

OXOID. **Manual Oxoid.** 1ª edição (português). 2000.

POPs do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília.

QUINN, P.J; CARTER, M.E; MARKEY, B; CARTER, G.R; **Clinical Veterinary Microbiology.** Editora WOLFE. Dublin, 1994.

QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J; LEONARD, F.C; **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** Editora ARTMED. Porto Alegre, 2005.

SANGIONE, L. A.; PEREIRA, D. I. B.; VOGEL, F. S. F.; BOTTON, S. A. **Princípios de Biossegurança Aplicados aos Laboratórios de Ensino Universitário de Microbiologia e Parasitologia.** Ciência Rural, v.43, n.1, jan, 2013.

SILVA, G. N, FILHO; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia Manual de Aulas Práticas**. EDITORA DA UFSC. Florianópolis, 2007.